

Rozprawa doktorska
Streszczenie rozszerzone

**Efektywność technik modyfikujących procesy
biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w
gruncie z terenu dołu urobkowego**

Autor:
mgr Katarzyna Wojtowicz

Promotor:
dr hab. inż. Teresa Steliga,
prof. INiG-PIB



**Politechnika
Śląska**

Dyscyplina naukowa: Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka
Gliwice, 2026

Niniejsza rozprawa doktorska została opracowana na podstawie siedmiu spójnych tematycznie publikacji naukowych, których szczegóły zostały przedstawione poniżej.

- I. **Katarzyna Wojtowicz**, T. Steliga, P., Kapusta, J. Brzeszcz, T. Skalski, *Evaluation of the Effectiveness of the Biopreparation in Combination with the Polymer γ -PGA for the Biodegradation of Petroleum Contaminants in Soil*, Materials, Volume 15(2), 400, 2022.
DOI: 10.3390/ma15020400
(IF₂₀₂₂ = 3,4);
Wkład **Katarzyny Wojtowicz**, zgodnie z oświadczeniem autorskim wynosił 40% i obejmował: opracowanie koncepcji artykułu, pozyskanie finansowania, analizę formalną, przeprowadzenie i opracowanie wyników badań, przygotowanie metodologii, opracowanie manuskryptu oraz wykonanie przeglądu literaturowego, a także przegląd i redakcję tekstu.
- II. **Katarzyna Wojtowicz**, T. Steliga, T. Skalski, P., Kapusta, *Influence of Biosurfactants on the Efficiency of Petroleum Hydrocarbons Biodegradation in Soil*, Sustainability, Volume 17(14), 6520, 2025.
DOI: 10.3390/su17146520
(IF₂₀₂₅ = 3,3);
Wkład **Katarzyny Wojtowicz**, zgodnie z oświadczeniem autorskim wynosił 70% i obejmował: opracowanie koncepcji artykułu, przygotowanie metodologii, walidację wyników, analizę formalną, przeprowadzenie i opracowanie wyników badań, opracowanie manuskryptu oraz wykonanie przeglądu literaturowego, a także przegląd i redakcję tekstu.
- III. **Katarzyna Wojtowicz**, T. Steliga, P., Kapusta, J. Brzeszcz, *Oil-Contaminated Soil Remediation with Biodegradation by Autochthonous Microorganisms and Phytoremediation by Maize (*Zea mays*)*, Molecules, Volume 28(16), 6104, 2023. DOI: 10.3390/molecules28166104
(IF₂₀₂₃ = 4,2);
Wkład **Katarzyny Wojtowicz**, zgodnie z oświadczeniem autorskim wynosił 48% i obejmował: opracowanie koncepcji artykułu, przygotowanie oprogramowania, walidację wyników, analizę formalną, przeprowadzenie i opracowanie wyników badań, a także opracowanie manuskryptu oraz wykonanie przeglądu literaturowego.
- IV. **Katarzyna Wojtowicz**, T. Steliga, P., Kapusta, *Evaluation of the Effectiveness of Bioaugmentation-Assisted Phytoremediation of Soils Contaminated with Petroleum Hydrocarbons Using *Echinacea purpurea**, Applied Sciences (Basel), Volume 13(24), 13077, 2023.
DOI: 10.3390/app132413077
(IF₂₀₂₃ = 2,5);
Wkład **Katarzyny Wojtowicz**, zgodnie z oświadczeniem autorskim wynosił 50% i obejmował: opracowanie koncepcji artykułu, przygotowanie oprogramowania,

walidację wyników, analizę formalną, przeprowadzenie i opracowanie wyników badań, a także opracowanie manuskryptu oraz wykonanie przeglądu literaturowego.

- V. **Katarzyna Wojtowicz**, T. Steliga, J. Brzeszcz, J. Fyda, T. Skalski, P., Kapusta, *Phytoremediation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons using the wild plants Scirpus sylvaticus and Cirsium oleraceum, supported by bioaugmentation*, International Biodeterioration & Biodegradation, Volume 206, 106217, 2026.
DOI: 10.1016/j.ibiod.2025.106217
(IF₂₀₂₅ = 4,1);
Wkład **Katarzyny Wojtowicz**, zgodnie z oświadczeniem autorskim wynosił **50%** i obejmował: opracowanie koncepcji artykułu, analizę formalną, przeprowadzenie i opracowanie wyników badań, przygotowanie metodologii, opracowanie manuskryptu oraz wykonanie przeglądu literaturowego, a także przegląd i redakcję tekstu.
- VI. **Katarzyna Wojtowicz**, T. Steliga, P., Kapusta, J. Brzeszcz, *The Role of Graphene Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles in Enhancing the Effectiveness of Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils Using Lolium perenne*, Molecules, Volume 31(5), 890, 2026. DOI: 10.3390/molecules31050890
(IF₂₀₂₆ = 4,6);
Wkład **Katarzyny Wojtowicz**, zgodnie z oświadczeniem autorskim wynosił **40%** i obejmował: opracowanie koncepcji artykułu, przygotowanie metodologii, walidację wyników, analizę formalną, przeprowadzenie i opracowanie wyników badań, opracowanie manuskryptu oraz wykonanie przeglądu literaturowego, a także przegląd i redakcję tekstu.
- VII. T. Steliga, **Katarzyna Wojtowicz**, P., Kapusta, J. Brzeszcz, *Assessment of Biodegradation Efficiency of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Petroleum Hydrocarbons (TPH) in Soil Using Three Individual Bacterial Strains and Their Mixed Culture*, Molecules, Volume 25(3), 709, 2020.
DOI: 10.3390/molecules25030709
(IF₂₀₂₀ = 4,927);
Wkład **Katarzyny Wojtowicz**, zgodnie z oświadczeniem autorskim wynosił **25%** i obejmował: opracowanie koncepcji artykułu, analizę formalną, przeprowadzenie i opracowanie wyników badań, przygotowanie metodologii, a także opracowanie manuskryptu oraz wykonanie przeglądu literaturowego.

1 Wprowadzenie

Rosnąca industrializacja, wzrost liczby ludności oraz wysoki popyt na produkty petrochemiczne przyczyniły się do intensywnego rozwoju gospodarczego, który jednocześnie stał się jedną z głównych przyczyn zanieczyszczenia i degradacji środowiska glebowego. Szczególnie istotnym problemem środowiskowym jest zanieczyszczenie gleb substancjami ropopochodnymi, związane przede wszystkim z wydobyciem, transportem i przetwarzaniem ropy naftowej (Mekonnen et al., 2024; Ossai et al., 2020; Singha and Pandey, 2021). Ponadto brak recyklingu olejów odpadowych i składowanie niebezpiecznych odpadów olejowych na składowiskach bez odpowiedniego zarządzania w latach 70. XX w., wpłynęło na powstanie tzw. skażeń historycznych (doły urobkowe), które szczególnie trudno ulegają procesowi oczyszczania. Obecność węglowodorów ropopochodnych w glebach wiąże się jednak nie tylko z istotnymi zagrożeniami dla środowiska przyrodniczego, ale również dla zdrowia ludzi i zwierząt (Daâssi & Qabil Almaghribi, 2022). Dlatego w ostatnich latach obserwowany jest intensywny rozwój badań ukierunkowany na doskonalenie istniejących oraz opracowywanie nowych metod rekultywacji gruntów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi.

Szczególnym przykładem obszaru górniczego, zanieczyszczonego węglowodorami ropopochodnymi jest teren złoża Grabownica, na którym w wyniku wieloletniej działalności wiertniczej powstały liczne doły urobkowe wykorzystywane w przeszłości do deponowania odpadów wiertniczych zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi (Steliga, 2009). Długotrwałe składowanie tych odpadów bezpośrednio w obrębie dołów urobkowych doprowadziło do trwałego skażenia gruntów oraz stworzyło realne zagrożenie dla środowiska gruntowo-wodnego, co uzasadniało podjęcie działań rekultywacyjnych ukierunkowanych na ograniczenie stopnia zanieczyszczenia i przywrócenie właściwości użytkowych zdegradowanych terenów. Pomimo dostępności wielu metod bioremediacyjnych wykorzystywanych do oczyszczania gruntów zanieczyszczonych tego typu związkami chemicznymi, w przypadku gleb pochodzących z terenów dołów urobkowych kopalni Grabownica ich skuteczność okazała się niewystarczająca.

W Instytucie Nafty i Gazu – Państwowym Instytucie Badawczym w celu oczyszczania gruntów z terenów dołów urobkowych opracowano technologię etapowego oczyszczania odpadów wiertniczych zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi zdeponowanych w starych dołach urobkowych metodą *in-situ*, która umożliwia znaczne obniżenie stężeń węglowodorów ropopochodnych (Steliga et.al., 2012, 2018a). Jednakże na obszarze kilku dołów urobkowych po 3-letnim okresie prowadzenia prac bioremediacyjnych stężenie zanieczyszczeń ropopochodnych kształtowały się na poziomie 4 025 – 22 125 mg/kg s.m., co nie świadczy o osiągnięciu zadowalającego stopnia oczyszczenia. W związku z tym istniała potrzeba opracowania metod umożliwiających głębsze doczyszczanie gruntów z dołów urobkowych ukierunkowanych na zwiększenie efektywności degradacji zarówno węglowodorów alifatycznych, jak i aromatycznych w glebie, a także na obniżenie jej toksyczności.

W tym kontekście postawiono ***hipotezę, że głębsze doczyszczanie gruntów z dołów urobkowych można będzie osiągnąć poprzez modyfikację istniejących technik***

bioremediacyjnych i opracowanie zintegrowanych strategii zwiększających efektywność biodegradacji węglowodorów ropopochodnych.

Celem naukowym pracy była identyfikacja i analiza kluczowych parametrów umożliwiających kompleksową ocenę efektywności zaproponowanych strategii bioremediacji gruntów z dołów urobkowych.

Celem użytkowym było opracowanie skutecznych i przyjaznych dla środowiska metod oczyszczania gleb zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi, umożliwiających przywrócenie właściwości użytkowych zdegradowanych terenów. Badania prowadzone na rzeczywistych próbkach gleb z dołów urobkowych zanieczyszczonych zestarzałymi węglowodorami ropopochodnymi pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych wyników, co zwiększa możliwość ich wykorzystania w przyszłości w warunkach przemysłowych.

Cele szczegółowe:

- Ocena wpływu zastosowania dodatków (γ -PGA oraz wytypowanych biosurfaktantów) modyfikujących proces inokulacji biopreparatem opracowanym na bazie bakterii autochtonicznych w celu zwiększenia efektywności biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w gruncie z terenu dołu urobkowego.
- Określenie wpływu wzbogacenia biopreparatu bakteryjnego w wybrane szczepy grzybów autochtonicznych na intensyfikację procesów biodegradacji węglowodorów alifatycznych oraz wielopierścieniowych węglowodorów ropopochodnych.
- Wprowadzenie fitoremediacji z wykorzystaniem roślin uprawnych w połączeniu z bioaugmentacją jako strategii umożliwiającej głębsze doczyszczenie gruntów z terenów dołów urobkowych.
- Zastosowanie fitoremediacji z wykorzystaniem roślin dziko rosnących, wspomaganą inokulacją bioopreparatem na bazie bakterii autochtonicznych w celu głębszego doczyszczenia gruntów historycznie skażonych węglowodorami ropopochodnymi z terenu dołu urobkowego.
- Scharakteryzowanie społeczności bakteryjnej i orzęskowej w glebie po przeprowadzonych procesach fitoremediacyjnych z wykorzystaniem roślin dziko rosnących.
- Ocena wpływu wybranych nanomateriałów na efektywność procesów bioremediacyjnych wspomaganą bioaugmentacją oraz określenie ich potencjału aplikacyjnego w fitoremediacji gruntu pochodzącego z dołu urobkowego.
- Ocena wpływu współwystępowania polichlorowanych bifenyli (PCB) na przebieg oraz efektywność biodegradacji węglowodorów ropopochodnych.

2 Materiały i metody

2.1 Materiały badawcze

Materiał badawczy w artykułach I-VII stanowiły:

- rzeczywiste próbki gleb pobrane z terenów dołów urobkowych (doły G6, G11, G44, G70) oraz z obszaru naturalnego wycieku ropy naftowej charakteryzujących się wysokim stężeniem węglowodorów ropopochodnych,. W artykule VII dodatkowo zastosowano komercyjnie dostępną glebę zanieczyszczoną PCB.
- biopreparaty opracowane na bazie bakterii lub bakterii i grzybów autochtonicznych, pojedyncze szczepy autochtoniczne *Mycolicibacterium frederiksbergense* IN53, *Rhodococcus erythropolis* IN129 oraz szczep *Rhodococcus* sp. IN306 pochodzący z pustyni Negev.
- dodatki wpływające na zwiększenie biodostępności zanieczyszczeń: γ -PGA, biosurfaktanty (rhamnolipidy, surfaktyna, komercyjnie dostępne preparaty JBR 425 i JBR 320, autorska mieszanina PSR), a także nanocząstki tlenku grafenu (GO-NP) oraz tlenku cynku (ZnO-NP).
- rośliny fitoremediacyjne: *Zea mays*, *Echinacea purpurea*, *Lolium perenne*, *Scirpus sylvaticus*, *Cirsium oleraceum*.

2.2 Metody badawcze

Ocena efektywności omówionych strategii bioremediacyjnych, w zależności od artykułu, opierała się na zróżnicowanym zestawie metod analitycznych obejmujących analizy respirometryczne, chromatograficzne, toksykologiczne, mikrobiologiczne oraz biologiczne, co umożliwiło wieloaspektową charakterystykę procesów oczyszczania gleb z dołów urobkowych.

3 Wpływ γ -PGA na efektywność biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w glebie z dołu urobkowego wspomaganą bioaugmentacją- Artykuł I

Biodegradacja z zastosowaniem biopreparatów opartych na mikroorganizmach autochtonicznych jest jedną z podstawowych i powszechnie stosowanych metod oczyszczania gleb historycznie zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi, która w warunkach odpowiedniej biostymulacji oraz kontroli parametrów środowiskowych pozwala na znaczną redukcję stężeń zanieczyszczeń (Greco Lucchina et al., 2026; Mekonnen et al., 2024).

W artykule I (Wojtowicz et al., 2022) przedstawiono kompleksowe badania biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie z dołu urobkowego G11 charakteryzującej się wysokim stężeniem TPH (19 774,23 mg/kg s.m.), BTEX (17,35 mg/kg s.m.) oraz WWA (27,03 mg/kg s.m.) poddanej inokulacji biopreparatem A1 opracowanym na bazie bakterii autochtonicznych oraz zmodyfikowanej inokulacji biopreparatem polegającej na dodatkowym wprowadzeniu do gleby γ -PGA, co miało za zadanie zwiększyć biodostępność zanieczyszczeń, a w konsekwencji poprawić efektywność oczyszczania badanego gruntu.

Badania zaprezentowane w artykule prowadzono w warunkach laboratoryjnych oraz półtechnicznych. Badania laboratoryjne obejmowały analizy respirometryczne, na podstawie których wytypowano najbardziej optymalny spośród badanych stosunek biopreparatu do γ -PGA wynoszący 1:1, zapewniający największy wzrost aktywności biologicznej w układzie. Wyznaczony stosunek zastosowano następnie do inokulacji gleby w badaniach prowadzonych metodą przyzmożenia *ex-situ* w skali półtechnicznej na dwóch przyzmach doświadczalnych, w celu porównania skuteczności standardowej inokulacji biopreparatem oraz inokulacji zmodyfikowanej poprzez dodatek γ -PGA.

Badania prowadzone w warunkach półtechnicznych obejmowały monitoring zmian stężeń zanieczyszczeń ropopochodnych (n-alkany, BTEX, WWA) w glebie w trakcie oczyszczania z wykorzystaniem analiz chromatograficznych. Wykazano wpływ modyfikacji procesu inokulacji polegający na wprowadzeniu do gleby z biopreparatem roztworu γ -PGA, na efektywność biodegradacji wszystkich węglowodorów ropopochodnych oznaczonych w badanej glebie (Tabela 1). Ponadto identyfikacja węglowodorów z grupy izoprenoidów (Pr i F), należących do związków trudno biodegradowalnych, umożliwiła ocenę skuteczności zaproponowanych w artykule strategii bioremediacyjnych na podstawie zmian wartości wskaźników n-C₁₇/Pr i n-C₁₈/F.

Tabela 1 Porównanie efektywności biodegradacji wybranych grup węglowodorów ropopochodnych w glebie inokulowanej biopreparatem A1 oraz biopreparatem A1 i γ -PGA

Węglowodory	Efektywność biodegradacji w glebie inokulowanej biopreparatem A1 [%]	Efektywność biodegradacji w glebie inokulowanej biopreparatem A1 i γ -PGA [%]
TPH	66,03	79,21
Węglowodory niezidentyfikowane	59,49	71,84
\sum nC ₉ –nC ₂₁	86,52 - 94,59	96,57 - 99,55
\sum nC ₂₂ –nC ₃₀	44,62 - 77,77	80,35 - 88,35
\sum nC ₃₁ –nC ₄₀	25,13 - 40,60	46,43 - 65,73
BTEX	80,08	90,19
benzen	91,75	95,89
toluen	95,54	98,89
etylobenzen	93,15	97,69
ksleny	71,06 – 78,69	85,14 – 89,88
\sum WWAs	38,86	51,18
WWA dwupierścieniowe	71,58	81,06
WWA trypierścieniowe	63,73 – 64,44	68,63 – 72,22
WWA czteropierścieniowe	32,33 – 42,78	44,65 – 56,24
WWA pięciopierścieniowe	30,06	40,30 – 43,17
WWA sześciopierścieniowe	24,62	35,48 – 37,83

Badania prowadzone w skali półtechnicznej zaprezentowane w artykule I uzupełniono o monitoring toksykologiczny z zastosowaniem testów toksykologicznych Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit F™, Microtox® SPT i Ames, umożliwiające ocenę zaproponowanych strategii bioremediacyjnych na biocenozę glebową oraz określenie bezpieczeństwa ich stosowania.

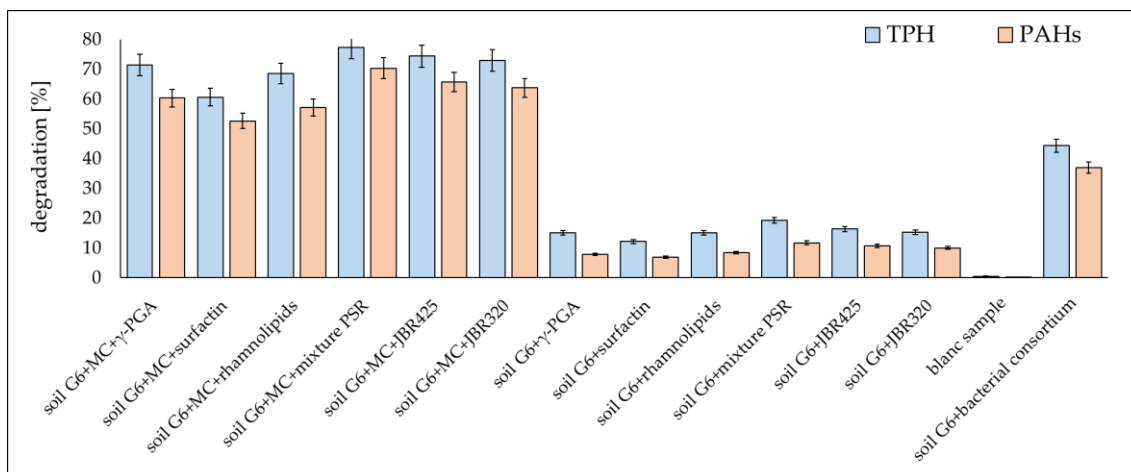
Kompleksowe badania bioremediacji gleby z dołu urobkowego zaprezentowane w artykule I wykazały, że zaproponowana modyfikacja techniki inokulacji gleby biopreparatem A1, polegająca na dodatkowym wprowadzeniu do matrycy glebowej preparatu γ -PGA, może przyczynić się do zwiększenia efektywności biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych oraz wpłynąć na poprawę jakości gleby z dołu urobkowego. Uzyskane wyniki wskazują na potencjał zastosowania tego rozwiązania w warunkach terenowych oraz stanowiły przesłankę do podjęcia dalszych badań ukierunkowanych na ocenę skuteczności modyfikacji techniki inokulacji z wykorzystaniem innych preparatów wspomagających biodegradację zanieczyszczeń, w tym biosurfaktantów.

4 Rola biosurfaktantów w poprawie efektywności biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie z dołu urobkowego – Artykuł II

Dostępne dane literaturowe wskazują, że na poprawę efektywności biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebach pozytywny wpływ może mieć wprowadzenie do układu biosurfaktantów, czyli biologicznych związków powierzchniowo czynnych umożliwiających obniżenia napięcia międzyfazowego, zwiększenia rozpuszczalności węglowodorów oraz ułatwienia desorpcji zanieczyszczeń z matrycy glebowej (Badmus et al., 2021; Zajic et al., 1983). W związku z powyższym w artykule II (Wojtowicz et al., 2025) podjęto badania mające na celu ocenę możliwości modyfikacji procesu inokulacji biopreparatem poprzez zastosowanie biosurfaktantów takich jak: preparaty JBR 425 i JBR 320, ramnolipidy, surfaktyna, γ -PGA oraz autorska mieszanina PSR, w celu poprawy efektywności biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w glebie z dołu urobkowego.

W artykule zaprezentowano kompleksowe badania laboratoryjne bioremediacji gleby z dołu urobkowego G6 poddanej w zależności od układu eksperymentalnego bioaugmentacji biopreparatem na bazie bakterii autochtonicznych MC, zmodyfikowanej bioaugmentacji biopreparatem MC poprzez dodatek wybranego biosurfaktanta (autorska mieszanina PSR, preparaty JBR 425, JBR 320, ramnolipidy, surfaktyna lub γ -PGA) w dwóch stężeniach biosurfaktanta w mieszaninie inokulującej: 1 g/dm^3 i 5 g/dm^3 lub wzbogaceniu wybranymi biosurfaktantami w stężeniach 1 g/dm^3 i 5 g/dm^3 (próbki kontrolne).

Przeprowadzone badania z wykorzystaniem analiz respirometrycznych oraz chromatograficznych gleby w zakresie oznaczania węglowodorów alifatycznych i WWA wykazały, że modyfikacja techniki inokulacji biopreparatem na bazie bakterii autochtonicznych, polegająca na wprowadzeniu do układu badanych biosurfaktantów, umożliwiła poprawę efektywności biodegradacji TPH w przedziale od 9,19–21,57% (przy stężeniu biosurfaktanta 1 g/dm^3) oraz od 16,31–32,97% (przy stężeniu biosurfaktanta 1 g/dm^3), a także WWA w przedziale od 6,7–24,74% (przy stężeniu biosurfaktanta 1 g/dm^3) oraz od 15,67–33,35% (przy stężeniu biosurfaktanta 1 g/dm^3) w porównaniu do samej bioaugmentacji (Rys. 1).



Rys. 1 Zestawienie stopni biodegradacji TPH i WWA w badanych układach reakcyjnych przy stężeniu biosurfaktantów 5 g/dm^3 (liczba powtórzeń $n = 7-10$, $p < 0,05$) (Wojtowicz et al., 2025) .

Wyniki analiz respirometrycznych i chromatograficznych wykazały również, że spośród testowanych biosurfaktantów największym potencjałem pod kątem możliwości wykorzystania w procesie wspomaganego biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w badanej glebie charakteryzowała się mieszanina PSR składająca się z rhamnolipidów, surfaktyny i γ -PGA.

Ponadto w artykule II oceniono bezpieczeństwo stosowania zaproponowanych strategii bioremediacyjnych oraz ich wpływ na spadek toksyczności badanego gruntu. W tym celu zastosowano pakiet testów toksykologicznych (Phytotoxkit™, Ostracodtoxikit F™ oraz Microtox SPT), umożliwiającą ocenę toksyczności względem organizmów reprezentujących wszystkie poziomy troficzne.

Kompleksowe wyniki badań zaprezentowanych w artykule II obejmujące analizy respirometryczne, chromatograficzne i ocenę ekotoksykologiczną gleby po zakończeniu eksperymentu, wykazały, że modyfikacja inokulacji biopreparatu na bazie bakterii autochtonicznych poprzez dodatek biosurfaktantów wpłynęła na poprawę efektywności bioremediacji gleby zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi i będzie mogła być w przyszłości wykorzystana w celu doczyszczenia gruntów na obszarach dołów urobkowych. Ponadto bazując na obserwacjach uzyskanych w ramach realizacji badań omówionych w artykułach I-II, zdecydowano się opracować zintegrowane strategie bioremediacyjne łączące ze sobą bioaugmentację z fitoremediacją, co miało na celu głębsze doczyszczenie gleb z dołów urobkowych.

5 Wpływ wzbogacenia biopreparatu bakteryjnego w wybrane autochtoniczne szczepy grzybów na efektywność biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie z dołu urobkowego oraz zastosowania fitoremediacji w celu jej głębszego doczyszczenia – Artykuły III i IV

Skład biopreparatu stanowi istotny czynnik determinujący efektywność biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w skażonych glebach. Dostępne źródła literaturowe

wskazują, że wzbogacenie biopreparatu opracowanego na bazie bakterii autochtonicznych w wybrane szczepy grzybów może istotnie wpływać na zwiększenie efektywności tego procesu, ze względu na zdolność grzybów do produkcji enzymów pozakomórkowych oraz degradacji szerokiego spektrum złożonych związków organicznych, w tym frakcji węglowodorów ropopochodnych (Steliga et al., 2018; Soto-Mancilla et al., 2026).

W artykule III (Wojtowicz et al., 2023b) zaprezentowano wyniki badań biodegradacji węglowodorów alifatycznych i WWA w glebie pobranej z terenu dołu urobkowego, którą poddano inokulacji dwoma rodzajami biopreparatów opracowanych na bazie mikroorganizmów autochtonicznych tj. biopreparatem bakteryjnym B1 oraz biopreparatem bakteryjno-grzybowym B2. Badania prowadzone metodą przyzmowania *ex-situ* z wykorzystaniem analiz chromatograficznych oraz toksykologicznych umożliwiły porównanie skuteczności zastosowanych mieszanin inokulujących w procesie bioremediacji gleby z dołu urobkowego.

Wykazano, że zaproponowana modyfikacja wzbogacenia biopreparatu na bazie bakterii autochtonicznych w wyselekcjonowane szczepy grzybów autochtonicznych wpłynęła na poprawę efektywności biodegradacji wszystkich węglowodorów ropopochodnych, jednak największy wpływ miała na biodegradację węglowodorów o długości łańcucha węglowego n-C₂₂–n-C₃₀ oraz węglowodorów ciężkich o długości łańcucha węglowego n-C₃₁–n-C₃₆, a także WWA (Tabela 2). Ponadto przeprowadzona ocena ekotoksykologiczna gleby z wykorzystaniem standardowego pakietu testów toksykologicznych Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit F™ oraz Microtox SPT potwierdziła skuteczność zaproponowanych biopreparatów w poprawie właściwości użytkowych gleby oraz bezpieczeństwo ich stosowania.

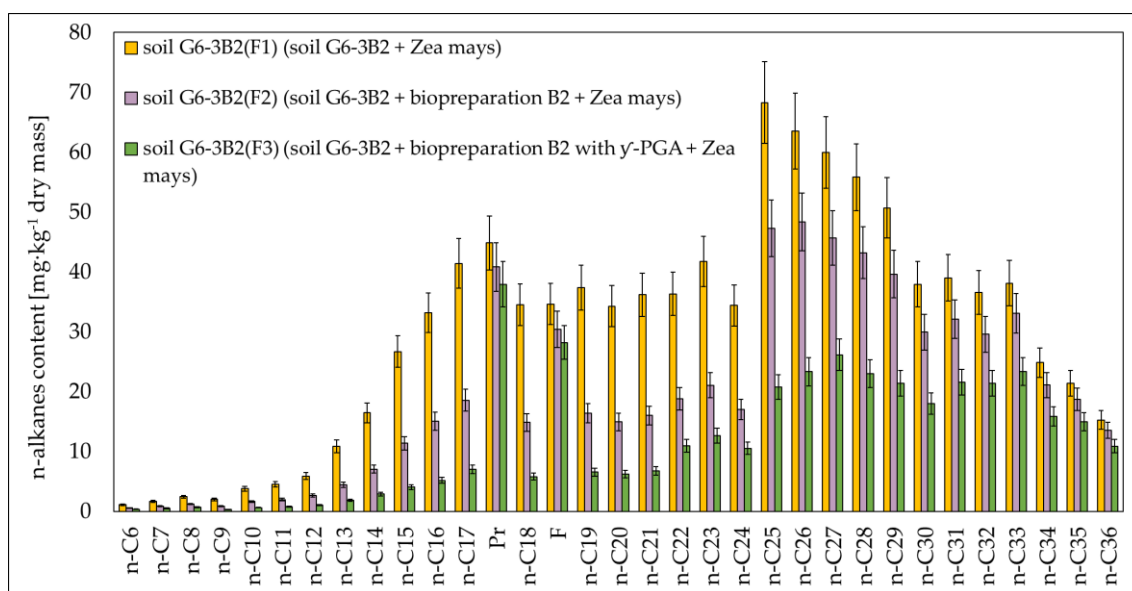
Tabela 2 Porównanie efektywności biodegradacji wybranych grup węglowodorów ropopochodnych w glebie inokulowanej biopreparatem B1 i B2

Węglowodory	Efektywność biodegradacji w glebie inokulowanej biopreparatem B1 [%]	Efektywność biodegradacji w glebie inokulowanej biopreparatem B2 [%]
TPH	31,85	41,67
Węglowodory niezidentyfikowane	31,44	37,97
nC ₆ –nC ₉	53,96 – 63,99	78,50 – 65,17
nC ₁₀ –nC ₂₁	34,78 – 64,58	54,08 -78,00
nC ₂₂ –nC ₃₀	10,25 – 32,44	22,05 – 47,63
nC ₃₁ –nC ₄₀	9,23 – 10,67	14,77 – 18,65
∑WWAs	27,41	34,73
WWA dwupierścieniowe	34,49	43,81
WWA trypierścieniowe	24,40 – 30,82	30,12 – 38,05
WWA czteropierścieniowe	15,22 – 21,71	18,79 – 26,80
WWA pięciopierścieniowe	11,42 – 11,46	16,56 – 16,61
WWA sześciopierścieniowe	7,96 – 8,37	14,77 – 15,27

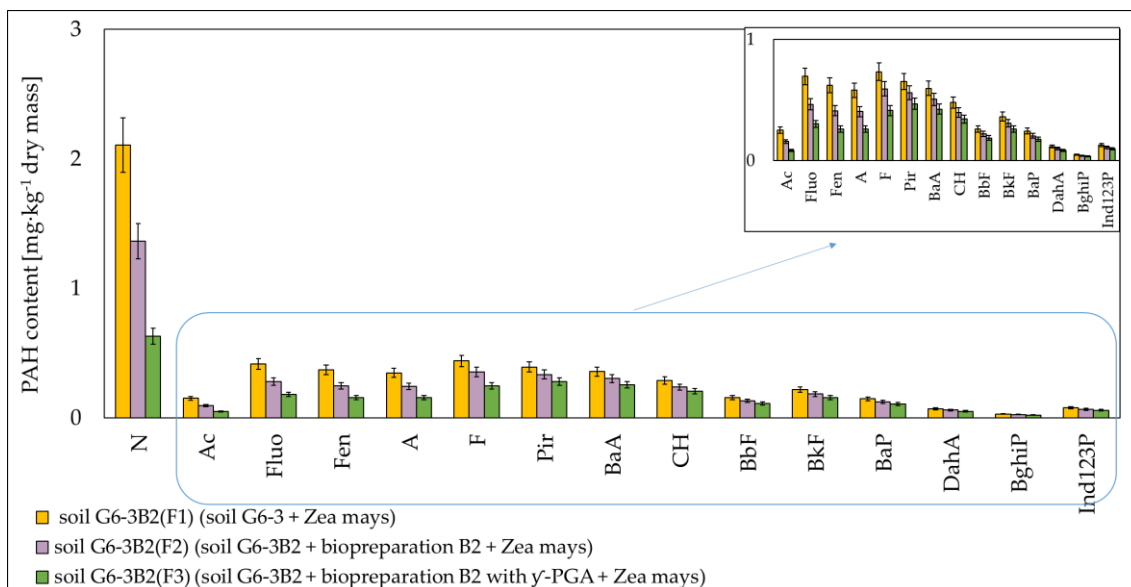
Istotnym elementem badań zaprezentowanym w artykułach III i IV było wprowadzenie kolejnej techniki bioremediacyjnej jaką była fitoremediacja, czyli technika polegająca na

wykorzystaniu roślin wraz z mikroorganizmami zasiedlającymi strefę korzeniową, do pobierania, gromadzenia lub biodegradacji substancji toksycznych (Barathi & Vasudevan, 2001; Tonelli et al., 2022). Badania fitoremediacyjne prowadzono metodą wazonową w skali półtechnicznej z wykorzystaniem dwóch gatunków roślin: *Zea mays* (Artykuł III) i *Echinacea purpurea* (Artykuł IV). Wyniki badań, analogicznie do poprzednich artykułów, oparto na wynikach analiz chromatograficznych oraz testach toksykologicznych prowadzonych dla próbek gleby, przy czym zakres badań rozszerzono o analizę morfologiczną roślin oraz, w artykule IV również o oznaczenie zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych w korzeniach i pędach *Echinacea purpurea*.

Badania fitoremediacji zaprezentowane w artykule III wykazały, że połączenie bioaugmentacji biopreparatem bakteryjno-grzybowym B2 z fitoremediacją z użyciem *Zea mays* umożliwia uzyskanie wysokich stopni biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebach z dołu urobkowego, które po sześciu miesiącach procesu wynosiły 49,08% dla TPH i 40,74% dla WWA. Ponadto wskazano, że omówiona w artykule I strategia modyfikacji procesu inokulacji polegająca na dodatkowym wprowadzeniu do układu roztworu γ -PGA w połączeniu z fitoremediacją umożliwiła uzyskanie jeszcze wyższej skuteczności oczyszczania, czego potwierdzeniem były uzyskane stopnie biodegradacji TPH i WWA po zakończeniu eksperymentu wynoszące odpowiednio 65,35% i 60,80%. Zaprezentowane w artykule wyniki analiz chromatograficznych wskazały ponadto, że fitoremediacja korzystnie wpływa na poprawę efektywności biodegradacji zarówno węglowodorów alifatycznych (Rys. 2) jak i WWA (Rys. 3) i może być wykorzystywana w celu doczyszczenia gleb na obszarach dołów urobkowych.

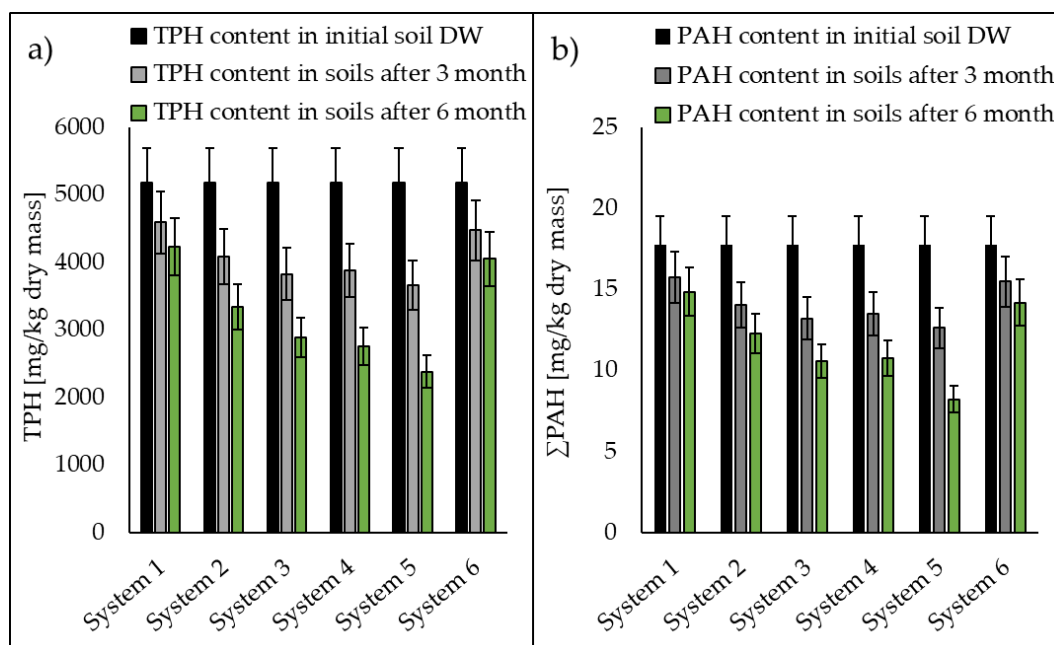


Rys. 2 Zestawienie stężeń n-alkanów oznaczonych w glebie poddanej fitoremediacji z wykorzystaniem *Zea mays* (Wojtowicz et al., 2023b).



Rys. 3 Zestawienie stężeń WWA oznaczonych w glebie poddanej fitoremediacji z wykorzystaniem *Zea mays* (Wojtowicz et al., 2023b)

Badania fitoremediacyjne omówione w artykule IV (Wojtowicz et al., 2023a) prowadzone z wykorzystaniem *Echinacea purpurea* potwierdziły, że połączenie fitoremediacji z odpowiednio opracowanym biopreparatem na bazie mikroorganizmów autochtonicznych umożliwia uzyskanie wysokich efektywności biodegradacji zarówno węglowodorów ropopochodnych jak i WWA w glebie z dołu urobkowego, a dodatkowe wzbogacenie układu w substancje wpływające na poprawę biodostępności zanieczyszczeń (γ -PGA) pozwala na dalsze zwiększenie efektywności procesu oczyszczania (Rys. 4).



Rys. 4 Oznaczone zawartości a) TPH i b) WWA w glebie z dołu urobkowego poddanej fitoremediacji z wykorzystaniem *Echinacea purpurea* w różnych wariantach wzbogacenia gleby (system 1- brak inokulacji, system 2 – inokulacja biopreparatem B1, system 3 – inokulacja biopreparatem B1 i γ -PGA, system 4 – inokulacja biopreparatem B21, system 5 – inokulacja biopreparatem B2 i γ -PGA, system 6 – inokulacja γ -PGA) (Wojtowicz et al., 2023a).

Rozszerzenie zakresu oznaczeń o analizę zawartości TPH i WWA w korzeniach i pędach *Echinacea purpurea*, potwierdziło aktywny udział roślin w procesie oczyszczania gleb skażonych węglowodorami. Wskazano, że niewielka ilość zanieczyszczeń ropopochodnych może być pobierana przez rośliny fitoremediacyjne z gleby i transportowana do tkanek roślinnych, gdzie może ulegać akumulacji lub dalszym przemianom biochemicznym, przy czym stopień ich zawartości w tkankach roślinnych zależy od zastosowanej metody inokulacji gleby.

Weryfikacji zaproponowanej metody fitoremediacji wspomaganą bioaugmentacją dokonano z wykorzystaniem testów toksykologicznych gleby po zakończeniu procesu oczyszczania, które potwierdziły korelację pomiędzy obniżeniem poziomu zanieczyszczeń a spadkiem toksyczności badanych gleb.

Przedstawione wyniki badań fitoremediacyjnych zaprezentowane w artykułach III i IV wskazały, że efektywność bioremediacji gleb pochodzących z terenów dołów urobkowych może być istotnie zwiększona poprzez łączone stosowanie kilku technik bioremediacyjnych, w tym bioaugmentacji, fitoremediacji oraz modyfikacji procesu inokulacji z wykorzystaniem dodatków takich jak γ -PGA. Uzyskane rezultaty stanowiły podstawę do podjęcia dalszych badań ukierunkowanych na wykorzystanie fitoremediacji wspomaganą bioaugmentacją w celu głębszego doczyszczenia gleb z obszarów dołów urobkowych.

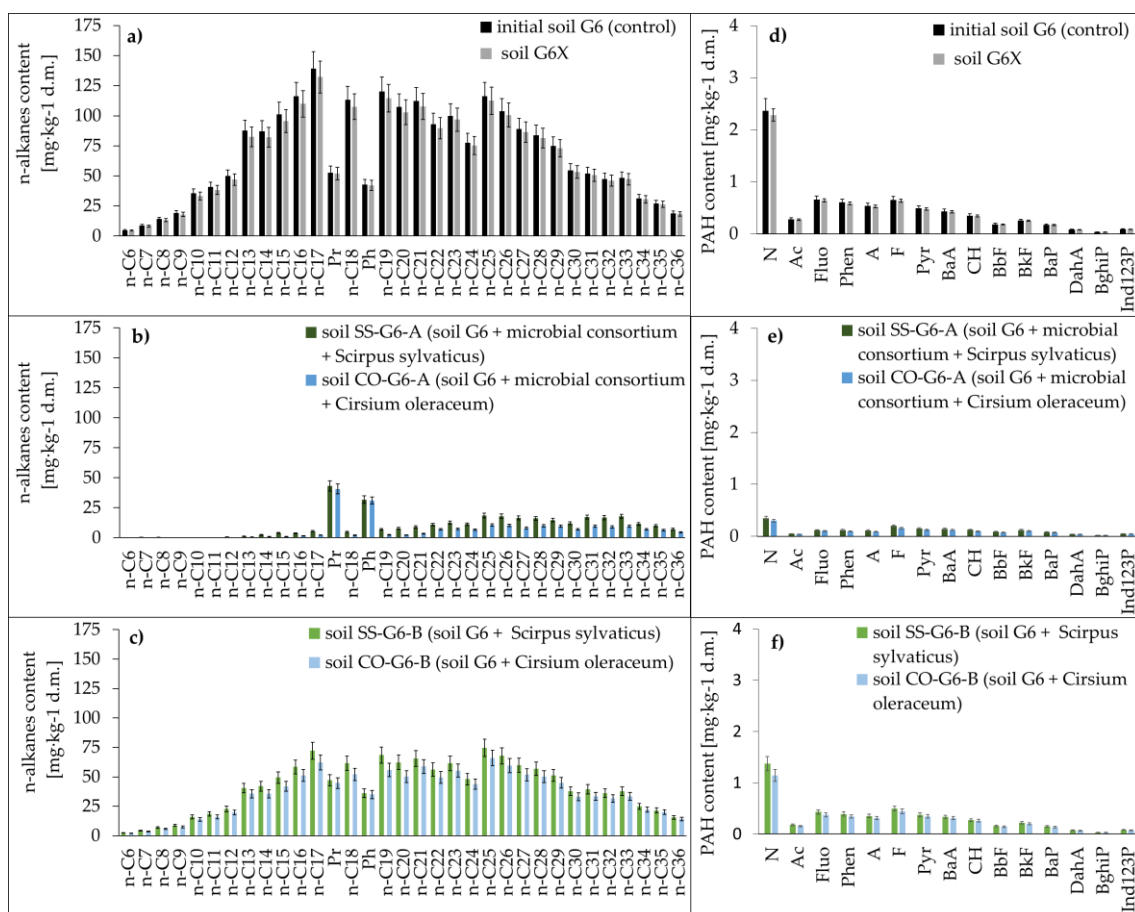
6 Zastosowanie roślin dziko rosnących w celu zwiększenia efektywności fitoremediacji gleb zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi – Artykuł V

Wyniki badań zaprezentowanych w artykułach III i IV wykazały, że połączenie techniki fitoremediacji z bioaugmentacją gleby biopreparatem na bazie mikroorganizmów autochtonicznych umożliwia uzyskanie wysokiej efektywności bioremediacji gleb z dołów urobkowych. W artykule V (Wojtowicz et al., 2026a) kontynuowano badania możliwości tej metody w celu doczyszczenia gruntów z terenów dołów urobkowych, jednak jako rośliny fitoremediacyjne wykorzystano dziką roślinność z gatunku *Scirpus sylvaticus* oraz *Cirsium oleraceum*, pobraną z terenu naturalnego wycieku ropy naftowej.

Badania fitoremediacji omówione w artykule V prowadzono w warunkach półtechnicznych, a ocenę skuteczności zaproponowanych strategii bioremediacyjnych oparto na wynikach analiz chromatograficznych gleby oraz korzeni i pędów roślin w zakresie zawartości węglowodorów ropopochodnych, analiz biomasy i tempa wzrostu roślin, a także wynikach testów toksykologicznych oraz analizie bioróżnorodności bakteryjnej i orzęskowej w zremediowanych glebach.

Przeprowadzone analizy chromatograficzne gleby po zakończeniu eksperymentu wykazały, że wykorzystanie w procesie fitoremediacji wspomaganą bioaugmentacją dzikiej roślinności przystosowanej do wzrostu na glebach skażonych ropą naftową pozwala na uzyskanie większej skuteczności oczyszczania gruntów z terenów dołów urobkowych niż przy użyciu *Zea mays* i *Echinacea purpurea*. Uzyskane wartości stopni biodegradacji TPH i WWA po zakończeniu eksperymentu kształtowały się na poziomie odpowiednio 89,47% i 75,52% w glebie inokulowanej biopreparatem MC i obsadzonej *Scirpus sylvaticus* oraz 93,96% i 79,55%

w glebie inokulowanej i obsadzonej *Cirsium oleraceum*, co świadczy o wysokiej efektywności biodegradacji zarówno węglowodorów alifatycznych, jak i aromatycznych. Dodatkowo szczegółowa analiza zmian stężeń poszczególnych węglowodorów ropopochodnych wchodzących w skład zanieczyszczeń badanej gleby potwierdziła zadowalającą skuteczność procesu w odniesieniu do wszystkich oznaczanych w glebie n-alkanów oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (Rys.5).



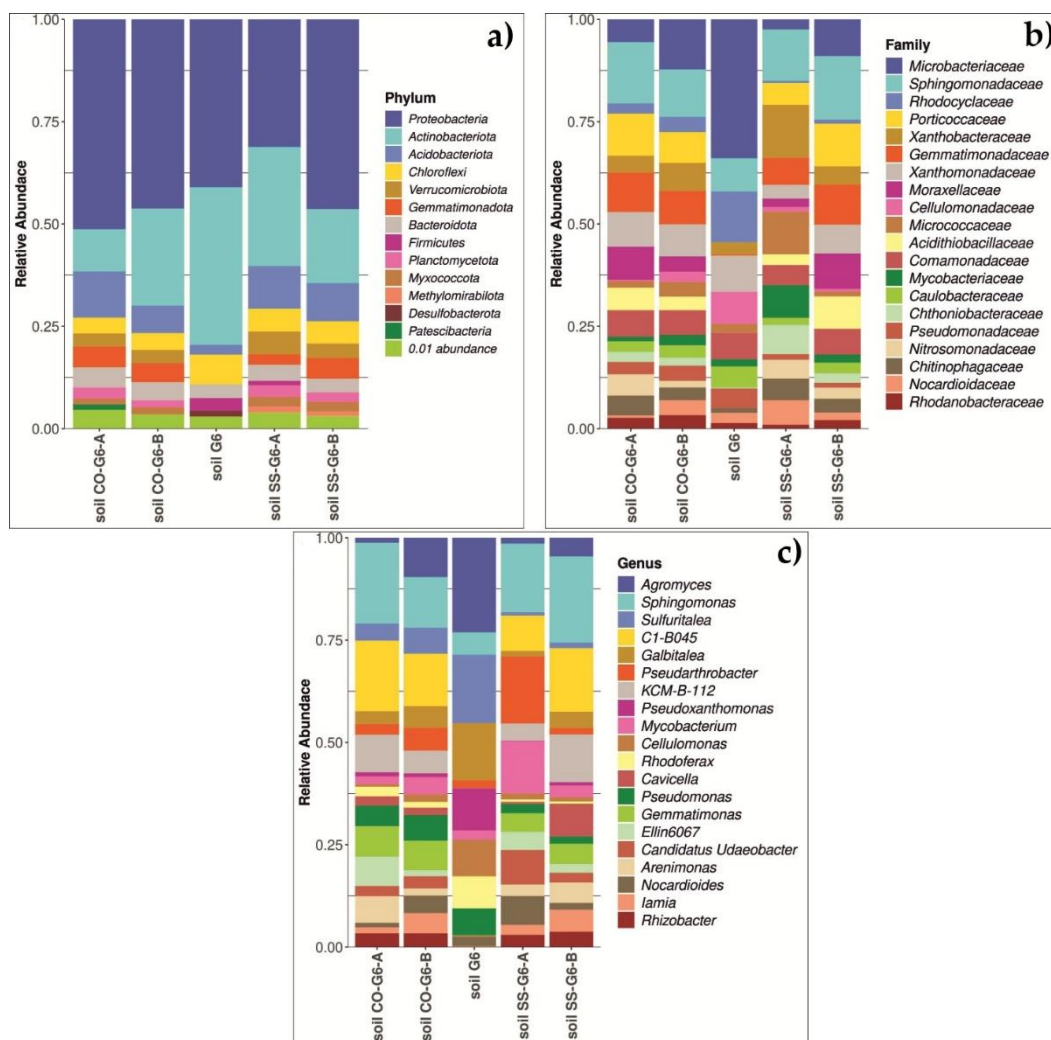
Rys. 5 Oznaczone zawartości n-alkanów i WWA w glebie a, d) wyjściowej i kontrolnej, b,e) poddanej fitoremediacji wspomagananej bioaugmentacją, c,f) poddanej wyłącznie fitoremediacji (Wojtowicz et al., 2026a).

Ponadto przeprowadzona analiza morfologiczna roślin fitoremediacyjnych wykazała korelacje pomiędzy wzrostem roślin, a efektywnością biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie. Wskazano, że tempo wzrostu i przyrost biomasy *Scirpus sylvaticus* i *Cirsium oleraceum* w glebach inokulowanych były zdecydowanie większe niż w glebach nie poddanych inokulacji biopreparatem. Dodatkowo analizy chromatograficzne korzeni i pędów *Scirpus sylvaticus* oraz *Cirsium oleraceum* pod kątem zawartości TPH i WWA umożliwiły ocenę wpływu cech morfologicznych i anatomicznych tych roślin na pobieranie oraz transport zanieczyszczeń z gleby do ich tkanek. Stwierdzono, że zawartość TPH i WWA w korzeniach i pędach *Cirsium oleraceum* uprawianego w warunkach analogicznych do *Scirpus sylvaticus* była wyraźnie większa, co wskazuje na wyższą zdolność tego gatunku do akumulacji i translokacji zanieczyszczeń. Różnice te można wiązać z odmienną budową systemu korzeniowego oraz specyficznymi cechami fizjologicznymi badanych roślin. Ponadto wyniki

badan sugerują, że inokulacja gleby biopreparatem sprzyjała zwiększeniu biodostępności zanieczyszczeń, a tym samym wspomagała ich pobieranie przez rośliny z podłoża.

Integralnym elementem weryfikacji skuteczności zaproponowanej strategii bioremediacji była ocena zmian właściwości ekotoksykologicznych gleby z wykorzystaniem testów Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit F™, Microtox SPT oraz MARA. Uzyskane wyniki potwierdziły istotne zmniejszenie negatywnego oddziaływania gleby po bioremediacji na organizmy testowe, na co wskazywał spadek stopnia toksyczności TU odnotowany we wszystkich analizowanych parametrach zastosowanych testów.

Dodatkowo w artykule V w celu kompleksowej oceny procesu fitoremediacji oraz fitoremediacji wspomaganą bioagumentacją zdecydowano się rozszerzyć podstawowy zakres badań prezentowany w pozostałych artykułach o charakterystykę mikroorganizmów glebowych. Przeprowadzone badania mikrobiologiczne wykazały zmiany w różnorodności mikrobiologicznej gleby po zakończeniu procesu oczyszczania, zróżnicowane w zależności od zastosowanego wariantu fitoremediacji i widoczne na poziomie rodzaju, rodziny i genu (Rys. 6).



Rys. 6 Wpływ fitoremediacji i bioagumentacji na względną liczebność taksonów bakteryjnych: a) typ, b) rodzina (20 najliczniej występujących), c) rodzaj (20 najliczniej występujących) (Wojtowicz et al., 2026a).

Wykazano, również że w zrekultywowanych glebach pojawiły się bakterie nieobecne zarówno w glebie wyjściowej, jak i w zastosowanym biopreparacie, co może wskazywać, że wraz z przeniesieniem roślin fitoremediacyjnych z obszaru zanieczyszczonego ropą naftową mogło dojść do introdukcji mikroorganizmów związanych z ich ryzosferą do gleby poddanej oczyszczaniu. Dodatkowe wprowadzenie do oczyszczanej gleby mikroorganizmów pochodzących ze środowiska zanieczyszczonego ropą naftową mogło stanowić jeden z czynników odpowiedzialnych za zwiększoną efektywność biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych. Ponadto zbadanie różnorodności i liczebności orzęsków w glebach po zakończeniu oczyszczania, umożliwiło nie tylko ocenę skuteczności remediacji za pomocą wskaźników mikrobiologicznych, lecz także identyfikację potencjalnych bioindykatorów regeneracji i stabilności ekosystemu glebowego.

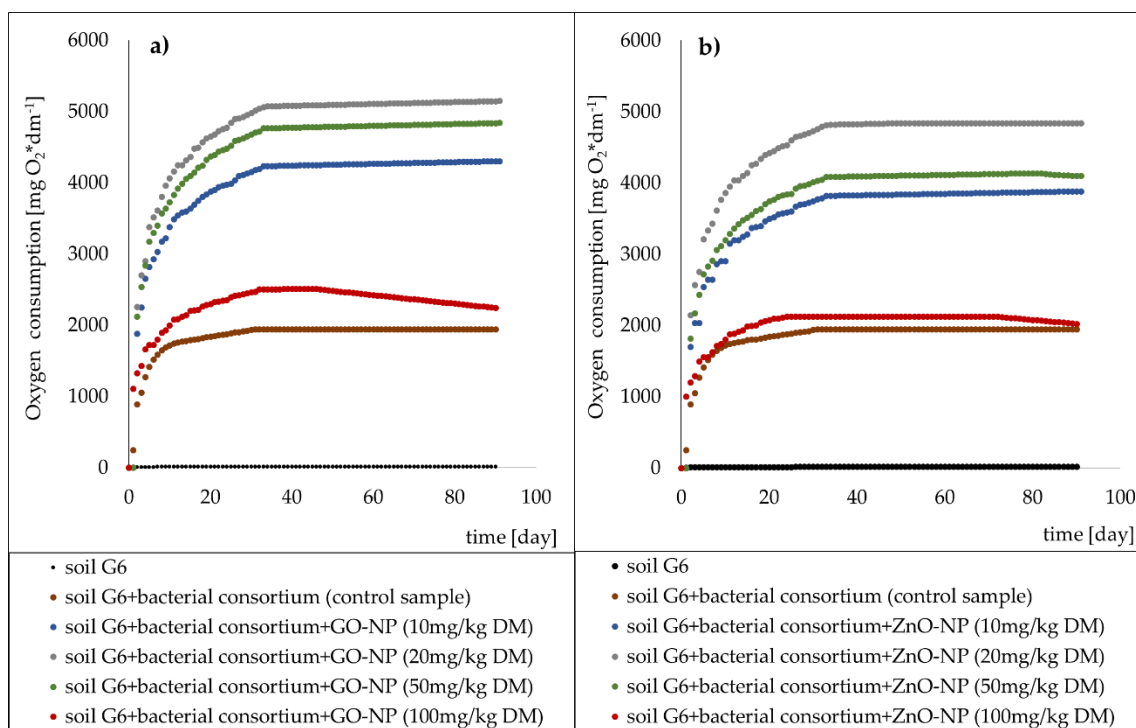
Kompleksowe wyniki badań nad fitoremediacją wspomaganą bioaugmentacją zaprezentowane w artykule V umożliwiły weryfikację skuteczności zaproponowanej strategii bioremediacyjnej w odniesieniu do gleb zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi. Wykazano, że kluczowe znaczenie dla efektywności procesu miało zastosowanie roślin naturalnie występujących na terenach skażonych ropą naftową, które charakteryzowały się wysokim stopniem adaptacji do warunków środowiskowych oraz potencjalnie sprzyjały rozwojowi mikroorganizmów ryzosferowych. Sama fitoremediacja prowadzona bez wspomagania bioaugmentacją wykazywała ograniczoną skuteczność, natomiast jej połączenie z bioaugmentacją prowadziło do wyraźnej intensyfikacji procesów biodegradacji, poprawy stopnia usunięcia węglowodorów oraz redukcji toksyczności oczyszczanych gleb. Uzyskane wyniki potwierdzają zasadność synergistycznego wykorzystania roślin i mikroorganizmów w procesach remediacji oraz wskazują na wysoki potencjał aplikacyjny opracowanej strategii w warunkach terenowych.

7 Wpływ nanomateriałów na efektywność bioremediacji gleby z dołu urobkowego – Artykuł VI

Obecnie coraz więcej badań z zakresu bioremediacji gruntów wskazuje, że nanomateriały dzięki swoim właściwościom fizykochemicznym mogą istotnie wpłynąć na poprawę efektywności oczyszczania gleb zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi. Udowodniono ich wpływ na mobilność zanieczyszczeń organicznych w środowisku glebowym, poprawę biodostępności, łagodzenie stresu środowiskowego oraz zmianę dostępności składników odżywczych.

W artykule VI (Wojtowicz et al., 2026b) przedstawiono wyniki badań biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie pochodzącej z dołu urobkowego, poddanej inokulacji biopreparatem MC oraz wzbogaceniu nanomateriałami: tlenkiem grafenu (GO-NP) lub tlenkiem cynku (ZnO-NP), które realizowano w skali laboratoryjnej z wykorzystaniem analiz respirometrycznych oraz chromatograficznych. Istotnym aspektem przeprowadzonych badań laboratoryjnych było zastosowanie różnych dawek nanomateriałów do wzbogacenia gleby, co umożliwiło określenie ich wpływu na przebieg procesów biodegradacyjnych oraz wyznaczenie dawki nanomateriałów zapewniającej największą efektywność biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych.

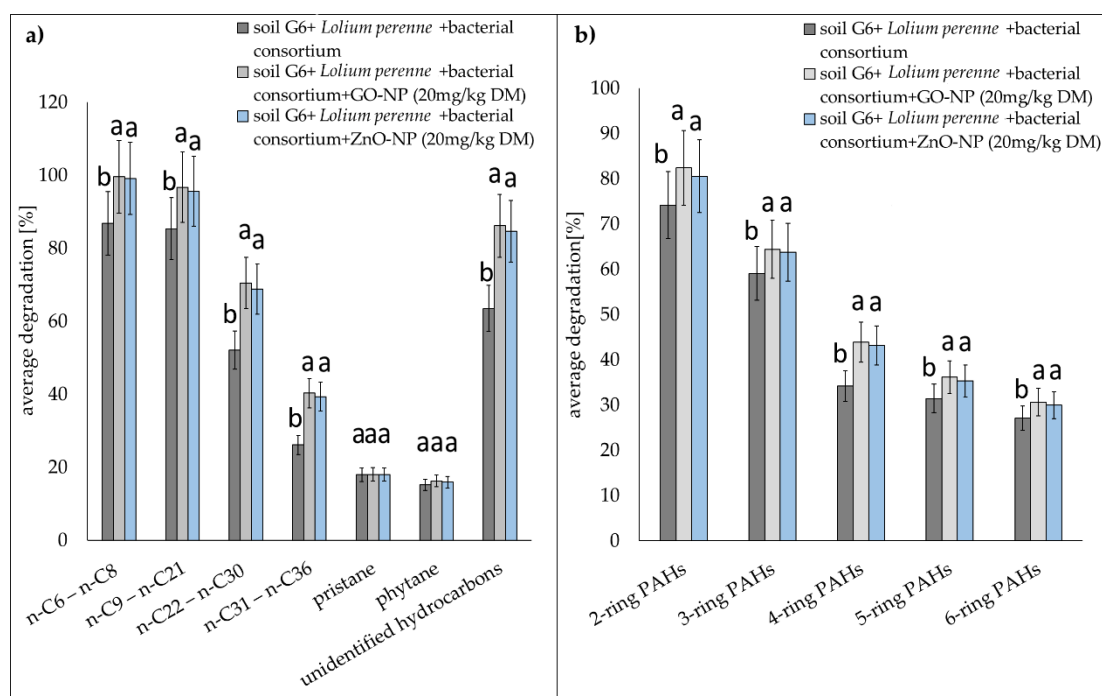
Otrzymane wyniki analiz respirometrycznych (Rys. 7) i chromatograficznych potwierdziły, że połączenie inokulacji ze wzbogaceniem gleby w badane nanomateriały umożliwiło istotną poprawę efektywności biodegradacji TPH i WWA, która w zależności od dawki nanomateriałów kształtowała się w granicach odpowiednio 50,41–70,47% i 40,48–56,19% dla GO-NP oraz 49,69–67,68% i 40,45–54,94% dla ZnO-NP. Ponadto badania prowadzone w skali laboratoryjnej umożliwiły dobór optymalnej dawki nanomateriałów wynoszącej 20 mg/kg s.m., którą wykorzystano w dalszych badaniach obejmujących połączenie fitoremediacji, bioaugmentacji oraz wzbogacenie gleby w nanomateriały.



Rys. 7 Zależność ilości zużytego tlenu [mg/dm^3] od czasu w glebie G6 inokulowanej biopreparatem oraz wzbogaconej w a) GO-NP, b) ZnO-NP (Wojtowicz et al., 2026b).

Badania fitoremediacji wspomaganej bioaugmentacją i nanomateriałami omówione w artykule VI prowadzono z wykorzystaniem *Lolium perenne*, jako rośliny fitoremediacyjnej. Oceny efektywności zaproponowanej strategii bioremediacyjnej dokonano na podstawie analiz chromatograficznych gleby pod kątem zawartości węglowodorów alifatycznych oraz WWA, a także zawartości tych związków w korzeniach i pędach *Lolium perenne*, co dodatkowo umożliwiło analizę ich dystrybucji w układzie gleba–roślina. Ponadto przeprowadzono analizę biomasy roślin po zakończeniu fitoremediacji oraz ocenę ekotoksykologiczną gleby, co pozwoliło na kompleksową ocenę skuteczności zastosowanej strategii oczyszczania.

Przeprowadzone badania wykazały że połączenie fitoremediacji z bioaugmentacją i wzbogaceniem gleby w nanomateriały skutkowało dalszym wzrostem efektywności oczyszczania gleby z dołu urobkowego. Stopnie biodegradacji TPH i WWA w glebie obsadzonej *Lolium perenne* i inokulowanej biopreparatem wynosiły odpowiednio 63,22% i 61,86%, natomiast wzbogacenie gleby GO-NP skutkowało wzrostem stopnia biodegradacji TPH do 81,85% i WWA do 73,19%, a zastosowanie ZnO-NP odpowiednio do 80,39% i 70,66%, co wskazuje na istotne zwiększenie efektywności procesu fitoremediacji wspomaganej w warunkach wzbogacenia gleby nanomateriałami.



Rys. 8 Średni stopień biodegradacji wybranych grup a) węglowodorów alifatycznych, b) WWA w glebie G6 poddanej fitoremediacji z użyciem *Lolium perenne* w różnych wariantach wzbogacenia gleby. Różne małe litery oznaczają istotne statystycznie różnice między wariantami zgodnie z jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Tukeya HSD ($p < 0,05$) (Wojtowicz *et al.*, 2026a).

Wyniki efektywności biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie korelowały z wynikami analizy morfologicznej oraz analizy biomasy *Lolium perenne*, które były analogiczne do wyników zaprezentowanych w artykułach IV i V, potwierdzając, że wyższej efektywności biodegradacji towarzyszył lepszy rozwój roślin oraz zwiększona produkcja biomasy. Przeprowadzona analiza korzeni i pędów *Lolium perenne* pod kątem zawartości TPH i WWA wykazała natomiast, wyższą zawartość zanieczyszczeń ropopochodnych w roślinach pochodzących z gleb poddanych inokulacji oraz wzbogaceniu w nanomateriały, co potwierdziło hipotezę, że nanomateriały mogą wpływać na zwiększenie biodostępności zanieczyszczeń dla roślin fitoremediacyjnych.

Efektywność zaproponowanej strategii bioremediacji gleb z dołów urobkowych polegającej na wzbogaceniu gleby w nanomateriały zweryfikowano z wykorzystaniem analiz toksykologicznych, które miały szczególne znaczenie w przypadku fitoremediacji wspomaganej nanomateriałami (GO-NP, ZnO-NP) ze względu na nadal niewystarczająco rozpoznany ich wpływ na środowisko glebowe oraz inne organizmy żywe.

Wyniki badań przedstawione w artykule VI wskazują, że zastosowanie nanomateriałów w odpowiednio dobranych dawkach, jako uzupełnienie bioaugmentacji i fitoremediacji wspomaganej bioaugmentacją, może stanowić interesującą alternatywę dla tradycyjnych biologicznych metod oczyszczania gleb z terenów dołów urobkowych. Uzyskane wyniki wskazują na wysoki potencjał tej strategii, przejawiający się zwiększeniem efektywności biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych oraz poprawą parametrów jakościowych

oczyszczanych gleb. Jednocześnie, ze względu na relatywnie nowe zastosowanie nanomateriałów w tego typu układach oraz brak pełnej wiedzy dotyczącej długoterminowych skutków ich obecności w środowisku glebowym, zasadne wydaje się prowadzenie dalszych badań nad możliwością ich wykorzystania w warunkach terenowych, w tym nad ich stabilnością, oddziaływaniem z biocenozą glebową oraz potencjalnymi efektami środowiskowymi w dłuższej perspektywie czasowej.

8 Efektywności biodegradacji węglowodorów ropopochodnych przy współwystępowaniu skażenia polichlorowanymi bifenylami (PCB) – Artykuł VII

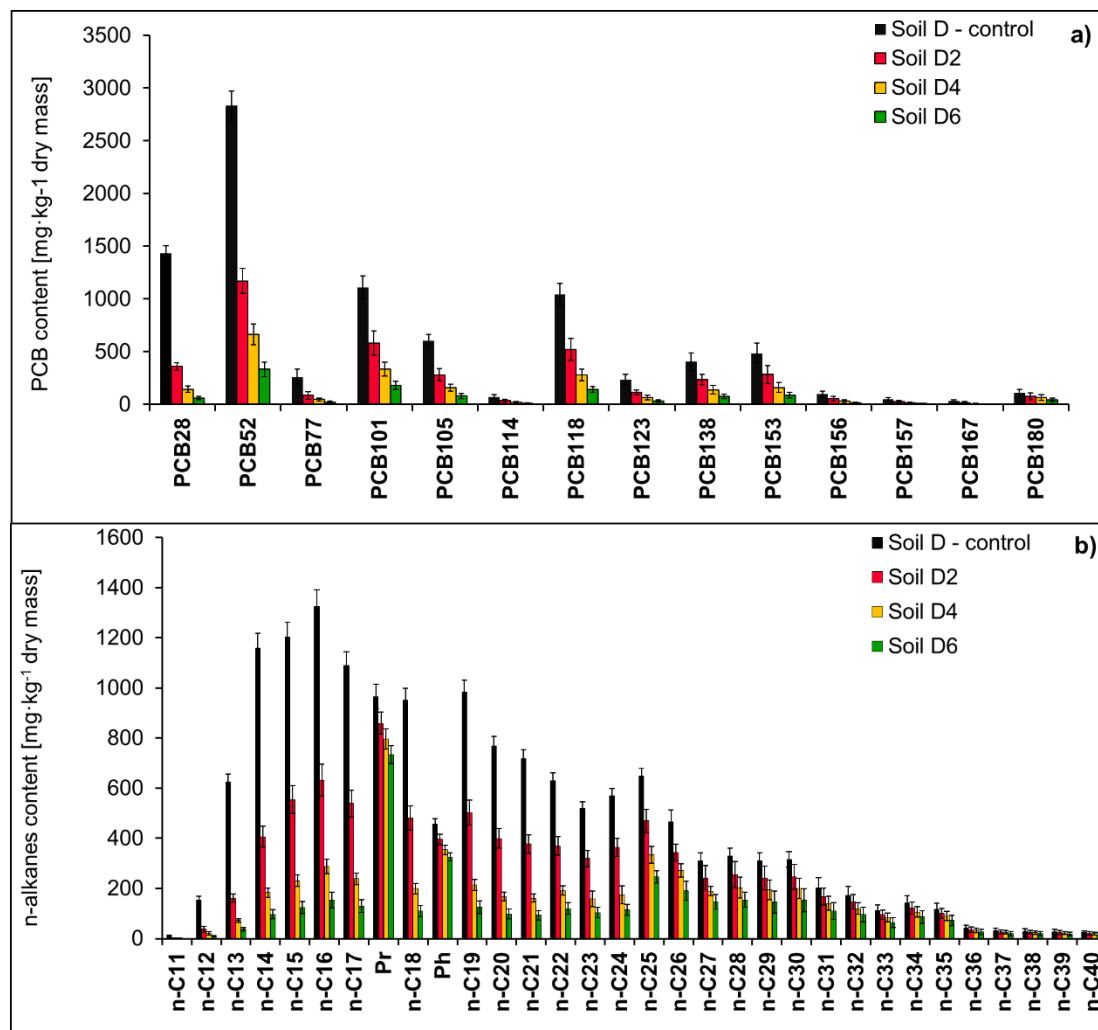
Analizując dostępne źródła literaturowe dotyczące bioremediacji gleb historycznie zanieczyszczonych w wyniku działalności górniczej, można znaleźć informacje, że obecność w glebie polichlorowanych bifenyli, może ograniczać funkcje bakterii degradujących węglowodory ropopochodne ze względu na ich niską biodostępność i toksyczny wpływ na mikrobiotę glebową. W związku z powyższym w artykule VII postanowiono doświadczalnie sprawdzić skuteczność techniki bioaugmentacji w poprawie efektywności biodegradacji węglowodorów ropopochodnych przy współwystępowaniu w glebie zanieczyszczeń z grupy PCB.

Badania biodegradacji zaprezentowane w artykule VII (Steliga et al., 2020) prowadzono w skali laboratoryjnej oraz póltechnicznej metodą przyzmowania *ex-situ*. Badania laboratoryjne realizowane na trzech rodzajach gleb, tj. glebie zanieczyszczonej wyłącznie PCB, glebie zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi oraz glebie współzanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi i PCB, z wykorzystaniem analiz respirometrycznych i chromatograficznych wykazały zróżnicowaną skuteczność zastosowanych wariantów inokulacji w zależności od rodzaju zanieczyszczeń. Wskazano, że w przypadku gleb zanieczyszczonej różnymi rodzajami zanieczyszczeń (w naszym przypadku TPH i PCB) wskazane jest stosowanie w zabiegu inokulacji biopreparatu M1 opartego na kilku szczepach bakteryjnych o zróżnicowanym spektrum działania, który wytypowano do dalszych badań prowadzonych metodą przyzmowania *ex-situ*.

Badania monitoringowe prowadzone w warunkach póltechnicznych umożliwiły ocenę skuteczności biodegradacji zarówno węglowodorów ropopochodnych jak i PCB na kolejnych etapach oczyszczania oraz ocenę wpływu zastosowanej strategii bioremediacyjnej na poprawę jakości badanej gleby (Rys. 9). Wskazano, że w wyniku inokulacji gleby biopreparatem M1 możliwe było istotne obniżenie stężenia zanieczyszczeń oznaczonych w badanej glebie, wynoszące po sześciu miesiącach 70,8% dla TPH i 84,5% dla PCB. Ponadto obliczone stałe szybkości biodegradacji poszczególnych grup zanieczyszczeń potwierdziły wysoką skuteczność zastosowanego biopreparatu we wspomaganiu oczyszczania gleby z dołu urobkowego zanieczyszczonej zarówno węglowodorami ropopochodnymi jak i PCB.

Przeprowadzone testy toksykologiczne Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit F™, Microtox SPT, MARA oraz Ames wykazały obniżenie toksyczności gleby w wyniku zastosowanej strategii bioremediacyjnej, przy braku stwierdzenia powstawania toksycznych metabolitów pośrednich w warunkach prowadzonych badań. Wyniki te stanowią istotne uzupełnienie oceny

skuteczności procesu oczyszczania, szczególnie w świetle nadal ograniczonej wiedzy na temat oddziaływania metabolitów powstających podczas degradacji TPH i PCB na organizmy żywe.



Rys. 9 Zestawienie stężeń a) kongenerów PCB, b) n-alkanów oznaczonych w niesterylnej glebie D poddanej inokulacji biopreparatem MI (Steliga et al., 2020).

Badania zaprezentowane w artykule VII stanowiły uzupełnienie dotychczas omówionych prac nad efektywnością bioremediacji gleb z terenów dołów urobkowych, wskazując, że bioaugmentacja z wykorzystaniem odpowiednio dobranego biopreparatu opracowanego na bazie bakterii o szerokim potencjale degradacyjnym stanowi obiecujące rozwiązanie w oczyszczaniu gleb współzanieczyszczonych różnymi grupami związków organicznych.

9 Podsumowanie

W niniejszej rozprawie doktorskiej zaprezentowano i przeanalizowano różnorodne podejścia ukierunkowane na zwiększenie efektywności biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebach pochodzących z terenów dołów urobkowych. Istotnym elementem pracy było interdyscyplinarne podejście do badanego zagadnienia, integrujące problematykę z zakresu wiertnictwa, inżynierii środowiska, analityki chemicznej, mikrobiologii oraz

ekotoksykologii, co pozwoliło na kompleksowe ujęcie problemu oraz wieloaspektową ocenę skuteczności zaproponowanych strategii bioremediacji. Przedstawione w artykułach wyniki badań umożliwiły realizację wszystkich założonych celów pracy doktorskiej oraz sformułowanie najważniejszych wniosków:

- Zwiększenie efektywności biodegradacji węglowodorów ropopochodnych może być realizowane zarówno poprzez modyfikację procesu bioaugmentacji, jak i poprzez łączenie różnych technik bioremediacyjnych.
- Modyfikacja procesu bioaugmentacji z wykorzystaniem dodatków zwiększających biodostępność zanieczyszczeń, takich jak kwas γ -poliglutaminowy (γ -PGA) czy biosurfaktanty stanowi skuteczny sposób intensyfikacji biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w glebach z dołów urobkowych.
- Połączenie fitoremediacji z bioaugmentacją może stanowić skuteczną metodę „doczyszczania” gleb zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi pochodzącymi z terenów dołów urobkowych.
- Wyższą efektywność oczyszczania gleb z terenów dołów urobkowych można uzyskać poprzez zastosowanie w fitoremediacji roślin dziko rosnących, naturalnie występujących na obszarach zanieczyszczonych ropą naftową, takich jak *Scirpus sylvaticus* i *Cirsium oleraceum*, niż roślin uprawnych, takich jak *Zea mays* i *Echinacea purpurea*.
- Wzbogacenie gleby w nanomateriały może stanowić skuteczny sposób zwiększania efektywności bioaugmentacji oraz fitoremediacji wspomaganą bioaugmentacją, prowadząc do zwiększenia efektywności biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebach.
- Bioremediacja gleb współzanieczyszczonych różnymi grupami zanieczyszczeń organicznych powinna być prowadzona z wykorzystaniem biopreparatów opracowanych na bazie mikroorganizmów o szerokim spektrum działania, zdolnych do jednoczesnego rozkładu związków o odmiennej budowie chemicznej.
- Przeprowadzone testy toksykologiczne Phytotoxkit™, Ostracodtoxkit F™, Microtox SPT, MARA oraz Ames potwierdziły, że spadkowi zawartości zanieczyszczeń w oczyszczanej glebie towarzyszy obniżenie jej toksyczności.
- Kompleksowa ocena zaproponowanych strategii zwiększania efektywności biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebach z terenów dołów urobkowych potwierdza ich potencjał aplikacyjny oraz zasadność dalszych badań ukierunkowanych na wdrożenie tych rozwiązań w warunkach terenowych.

Bibliografia

1. Badmus S.O., Amusa H.K., Oyehan T.A., Saleh T.A. Environmental risks and toxicity of surfactants: overview of analysis, assessment, and remediation techniques. *Environmental Science and Pollution Research* **2021**, 28, 62085–62104. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16483-w>
2. Barathi S., Vasudevan N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International*

- 2001**, 26, 413–416. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00021-6](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00021-6)
3. Daâssi D., Qabil Almaghribi F. Petroleum-contaminated soil: environmental occurrence and remediation strategies. *3 Biotech* **2022**, 12, 139. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03198-z>
 4. Greco Lucchina P., Catania V., Di Trapani D., Petta E.M., Sciré Calabrisotto L., Vinti G., Quatrini P., Viviani G. Sequential biostimulation and bioaugmentation treatments of a diesel-contaminated soil: effect on hydrocarbon degradation and soil bacterial communities. *Applied Soil Ecology* **2026**, 219, 106802. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2026.106802>
 5. Mekonnen B.A., Aragaw T.A., Genet M.B. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: a review on principles, degradation mechanisms, and advancements. *Frontiers in Environmental Science* **2024**, 12, 1354422. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2024.1354422>
 6. Ossai I.C., Ahmed A., Hassan A., Hamid F.S. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology & Innovation* **2020**, 17, 100526. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526>
 7. Singha L.P., Pandey P. Rhizosphere assisted bioengineering approaches for the mitigation of petroleum hydrocarbons contamination in soil. *Critical Reviews in Biotechnology* **2021**, 41, 749–766. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1888066>
 8. Soto-Mancilla, M.; Fioroni, F.; Ebrecht, L.; Martin, M.; Mestre, Ma.C.; Fernández, N.V. Fungal Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Terrestrial Environments: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biodegradation* **2026**, 37, 68, doi:10.1007/s10532-026-10292-z.
 9. Steliga T. Bioremediacja odpadów wiertniczych zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi ze starych dołów urobkowych. Instytut Nafty i Gazu, Kraków **2009**
 10. Steliga T., Jakubowicz P., Kapusta P. Changes in toxicity during in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology* **2012**, 125, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.092>
 11. Steliga T., Jakubowicz P., Kapusta P., Wojtowicz K. Efektywność biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w zestarzałym odpadzie z dołu urobkowego. *Nafta-Gaz* **2018a**, 74, 752–758. <https://doi.org/10.18668/NG.2018.10.07>
 12. Steliga T.; Wojtowicz K.; Kapusta P.; Brzeszcz J. Assessment of Biodegradation Efficiency of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Petroleum Hydrocarbons (TPH) in Soil Using Three Individual Bacterial Strains and Their Mixed Culture. *Molecules* **2020**, 25, 709, doi:10.3390/molecules25030709.
 13. Tonelli F.C.P., Tonelli F.M.P., Lemos M.S., Nunes N.A.D.M. Mechanisms of phytoremediation, in: *Phytoremediation*. Elsevier, **2022**, 37–64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89874-4.00023-6>
 14. Wojtowicz K.; Steliga T.; Brzeszcz J.; Fyda J.; Skalski T.; Kapusta P. Phytoremediation of Soil Contaminated with Petroleum Hydrocarbons Using the Wild Plants *Scirpus Sylvaticus* and *Cirsium Oleraceum*, Supported by Bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2026a**, 206, 106217, doi:10.1016/j.ibiod.2025.106217.
 15. Wojtowicz K., Steliga T., Kapusta P. Evaluation of the Effectiveness of

- Bioaugmentation-Assisted Phytoremediation of Soils Contaminated with Petroleum Hydrocarbons Using *Echinacea purpurea*. *Applied Sciences* **2023a**, 13, 13077. <https://doi.org/10.3390/app132413077>
16. Wojtowicz K., Steliga T., Kapusta P., Brzeszcz J. The Role of Graphene Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles in Enhancing the Effectiveness of Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils Using *Lolium perenne*. *Molecules* **2026b**, 31, 890. <https://doi.org/10.3390/molecules31050890>
 17. Wojtowicz K., Steliga T., Kapusta P., Brzeszcz J.. Oil-Contaminated Soil Remediation with Biodegradation by Autochthonous Microorganisms and Phytoremediation by Maize (*Zea mays*). *Molecules* **2023b**, 28, 6104. <https://doi.org/10.3390/molecules28166104>
 18. Wojtowicz K.; Steliga T.; Kapusta P.; Brzeszcz J.; Skalski T. Evaluation of the Effectiveness of the Biopreparation in Combination with the Polymer γ -PGA for the Biodegradation of Petroleum Contaminants in Soil. *Materials* **2022**, 15, 400, doi:10.3390/ma15020400
 19. Wojtowicz K.; Steliga T.; Skalski T.; Kapusta P. Influence of Biosurfactants on the Efficiency of Petroleum Hydrocarbons Biodegradation in Soil. *Sustainability* **2025**, 17, 6520, doi:10.3390/su17146520.